

20.04.00

## 日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1 9 9 9 年 4 月 2 3 日

REC'D 09 JUN 2000

WIPO

PCT

出 願 番 号

Application Number:

平成 1 1 年特許願第 1 1 5 7 3 8 号

出 願 人

Applicant (s):

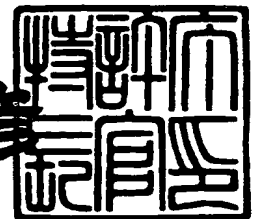
三菱化学株式会社

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 0 年 5 月 2 6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特 2 0 0 0 - 3 0 3 7 9 3 1

【書類名】 特許願

【整理番号】 98286M

【提出日】 平成11年 4月23日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 三菱化学  
株式会社横浜総合研究所内

【氏名】 田川 俊明

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1 0 0 0 番地 三菱化学  
株式会社横浜総合研究所内

【氏名】 細川 斉子

【特許出願人】

【識別番号】 000005968

【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

【代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 038357

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9805687

【プールの可否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗体結合リポソーム

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 脂質末端の一部がマレイミド化されたりポソームにポリアルキレングリコール部分を含む化合物及び抗体がそれぞれチオエーテル基を介して結合したりポソームであって、該抗体の結合量がリポソームを構成する全脂質 1 0 0 m g に対して 1 . 2 ~ 2 m g であるリポソーム。

【請求項 2】 該リポソームが、マレイミド基を有するリポソームと抗体由来のイオウ含有基とを反応させてチオエーテル結合を形成することにより得られるリポソームである、請求項 1 に記載のリポソーム。

【請求項 3】 該結合量が約 2 m g である請求項 1 又は 2 に記載のリポソーム。

【請求項 4】 抗体が G A H 抗体である請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

【請求項 5】 抗体のフラグメントが  $F(a b')_2$  である請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

【請求項 6】 抗腫瘍剤が封入された請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

【請求項 7】 抗腫瘍剤がドキソルビシン又はその塩である請求項 6 に記載のリポソーム。

【請求項 8】 ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のリポソーム。

【請求項 9】 該化合物が 2 つのポリエチレングリコール基を有する化合物である請求項 8 に記載のリポソーム。

【請求項 1 0】 ポリエチレングリコールの分子量が 2, 0 0 0 ~ 7, 0 0 0 ダルトンである請求項 8 又は 9 に記載のリポソーム。

【請求項 1 1】 ポリエチレングリコールの分子量が約 5, 0 0 0 ダルトンである請求項 8 又は 9 に記載のリポソーム。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

本発明はリポソームに関するものである。より具体的には、抗体及びポリアルキレングリコールが結合されており、治療効果に優れたリポソームに関するものである。

【0002】

【従来の技術】

薬剤を特定部位に大量に輸送する手段として、リポソームに薬剤を封入し、その表面に抗体を結合する方法が提案されている。特に、癌治療の分野において、抗腫瘍剤を封入した抗体結合リポソームの有効性が数多く報告されている (Konno et al., Cancer Res., 47, 4471, 1987; 特開昭58-134032号公報)。さらに、リポソームの問題点、すなわち封入物の漏出や、リポソームの凝集及び網内系器官での捕捉などを改善する方法として、リポソームにポリエチレングリコールを結合する方法が提案されている (特開平1-249717号公報、特開平2-149512号公報、Klibanov et al., FEBS Lett., 268, 235, 1990)。

【0003】

特開平4-346918号公報には、薬剤を内包するリポソーム表面のマレイミド基と、各々のチオール基を介して結合する蛋白質及びポリアルキレングリコール部分を含む化合物残基を有することを特徴とする薬剤含有蛋白質結合リポソームが開示されている。このリポソームは、リポソーム表面のマレイミド基に対して、抗体に結合したチオール基とポリアルキレングリコール部分を含む化合物に結合したチオール基とを反応させることによって製造され、従来のリポソームでみられたような肝臓、脾臓などの網内系での非特異的取り込みが抑制されており、選択的な化学療法を達成できるという特徴がある。

【0004】

上記公報には、リポソームに結合する抗体の量は具体的に説明されていないが、マレイミド基 (マレイミド化脂質) 1 モルに対して 0.1 % モルから 20 % モルのチオール化抗体 (換算すると全脂質 100 mg に対して 0.3 ~ 60 mg) を反応させることが説明されているが、実施例に具体的に記載されたりポソームの製造方法では、全脂質 100 mg に対して 5 mg の抗体を結合させており、上記公報には、それ以外の結合量についての具体的開示はない。

## 【0 0 0 5】

## 【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】

本発明者らは、特開平4-346918号公報に記載されたりボソームを基にして、さらに高い治療効果を達成できるリボソームを提供すべく鋭意研究を行った。その結果、特開平4-346918号公報の実施例に記載されたりボソームにおいて、抗体の結合量を低減させたところ、驚くべきことに、上記公報の実施例に記載されたりボソームよりもはるかに高い治療効果を達成できることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

## 【0 0 0 6】

すなわち本発明は、脂質末端の一部がマレイミド化されたりボソームにポリアルキレングリコールを含む化合物及び抗体がそれぞれチオエーテル基を介して結合したりボソームであって、該抗体の結合量がリボソームを構成する全脂質 1 0 0 m g に対して 1 . 2 ~ 2 m g であるリボソームを提供するものである。本発明のリボソームは、例えば、リボソームに導入されたマレイミド基と抗体由来のイオウ含有基とを反応させてチオエーテル結合を形成し、さらにチオール基を付与したポリアルキレングリコール部分を含む化合物のチオール基とマレイミド基を反応させることによって製造することができる。

## 【0 0 0 7】

本発明の好ましい態様によれば、該結合量が約 2 m g である上記リボソーム；抗体が G A H 抗体である上記リボソーム；抗体のフラグメントが  $F(a b')_2$  である上記リボソーム；抗腫瘍剤が封入された上記リボソーム；抗腫瘍剤がドキソルビシン又はその塩である上記リボソーム；ポリアルキレングリコールがポリエチレングリコールである上記リボソーム；該化合物が 2 つのポリエチレングリコール基を有する（2 本鎖）化合物である上記リボソーム；ポリエチレングリコールの分子量が 2, 0 0 0 ~ 7, 0 0 0 ダルトンである上記リボソーム；及びポリエチレングリコールの分子量が約 5, 0 0 0 ダルトンである上記リボソームが提供される。

## 【0 0 0 8】

## 【発明の実施の形態】

本発明のリポソームを構成する脂質としては、例えば、天然レシチン（例えば、卵黄レシチン、大豆レシチン）やジパルミトイルフォスファチジルコリン（DP PC）、ジミリストイルフォスファチジルコリン（DMPC）、ジステアロイルフォスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルフォスファチジルコリン（DOPC）、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン（DMPE）、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン（DOPE）、ジパルミトイルフォスファチジン酸（DPPA）、ジパルミトイルフォスファチジルグリセロール（DPPG）、ジミリストイルフォスファチジン酸（DMPA）等のリン脂質、スフィンゴ糖脂質、グリセロ糖脂質等の糖脂質、脂肪酸、両親媒性ジアルキルジメチルアンモニウム(dialkyl dimethylammonium amphiphiles)、ポリグリセロールアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルエーテル等(Liposome Technology, 2nd edition, vol.1, 141, 1993)、アルキルグリコシド、アルキルメチルグルカミド、アルキルシュークロースエステル、ジアルキルポリオキシエチレンエーテル、ジアルキルポリグリセロールエーテル等(Liposome Technology, 2nd edition, vol.1, 141, 1993)、ポリオキシエチレン-ポリ乳酸等の両親媒性ブロック共重合体等(特表平6-508831号公報)などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。これらの脂質は単独で、又は2種以上を組み合わせ用いることができ、さらにコレステロール等の非極性物質、DC-cho1 ( $3\beta$ -[N-(N',N'-dimethylaminoethyl)carbamoyl]cholesterol)等のコレステロール誘導体と組み合わせ用いてもよい。

#### 【0009】

本発明のリポソームにおいては、ポリアルキレングリコールを含む化合物及び必要に応じて抗体などの蛋白質の結合のために、脂質成分の一部として、例えばマレイミド化フォスファチジルエタノールアミンなどのマレイミド化された脂質(本明細書において「マレイミド化脂質」と呼ぶ。)を用いる必要がある。全脂質に対するマレイミド化脂質の割合は、通常、約0.5～10モル%である。

#### 【0010】

マレイミド化フォスファチジルエタノールアミンの例で説明すると、この化合物

はアミノ基に反応性を有するマレイミド含有化合物とフォスファチジルエタノールアミン (PE) のアミノ基との反応により得られる。該マレイミド含有化合物はカプロイル基、ベンゾイル基、フェニルブチリル基等の残基を含んでいてもよく、例えば、N-( $\epsilon$ -マレイミドカプロイルオキシ) スクシンイミド、N-サクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル) ブチレート、N-サクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル) プロピオネート、N-( $\gamma$ -マレイミドブチリルオキシ) スクシンイミド等を挙げることができる。PEとしてはジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン (DMPE)、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン (DOPE) 等のフォスファチジルエタノールアミン類が使用できるが、好ましくはDPPEである。脂質成分として、さらにステアリルアミン、ジセチルフォスフェートなどの荷電性物質を含んでいてもよい。また、本発明のリポソームは、ウイルスの一部または全部を組み込んだ融合リポソーム、例えばセンダイウイルスとリポソームを融合したリポソームであってもよい。

#### 【0011】

典型的なりポソームとしては、例えば、フォスファチジルコリン1モルに対して、コレステロールを0.3~1モル、好ましくは0.4~0.6モル、マレイミド化フォスファチジルエタノールアミンを0.01~0.2モル、好ましくは0.02~0.1モル、さらに好ましくは0.02~0.05モルを含む脂質組成物を用いることができ、フォスファチジン酸を加える場合には0.4モル以下、好ましくは0.15モル以下の脂質組成物を用いることができる。

#### 【0012】

本発明のリポソームの製造方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも適用可能である。また、本発明のリポソームの形態も特に限定されず、いかなる形態であってもよい。例えば、ガラス壁に付着させた脂質薄膜に水溶液を加え、機械的振盪を加えて形成するマルチラメラリポソーム (MLV) ; 超音波処理法、エタノール注入法、フレンチプレス法により得られるスモールユニラメラリポソーム (SUV) ; 界面活性剤除去法、逆相蒸発法 (リポソーム、砂本順三ら、南江堂、1998)、MLVを均一孔径を有するメンブランから加圧により押



し出すイクストゥレーション法等によって得られるラージユニラメラリポソーム (LUV) のいずれであってもよい (Liposome Technology 2nd edition vol.1, 141, 1993)。リポソームの粒径は、例えば、300 nm 以下、好ましくは30から200 nm 程度である。

#### 【0013】

本発明のリポソームには医薬を封入することができる。医薬の種類は特に限定されないが、例えば、ドキソルビシン (アドリアマイシン)、ダウノマイシン、ビンブラスチン、シスプラチン、5-フルオロウラシル (5-FU) 等の抗腫瘍剤；チモロール等のアドレナリン遮断剤；クロニジン等の高血圧剤；プロカインアミド等の制吐剤；クロロキニーネ等の抗マラリア剤；並びにそれらの薬学的に許容し得る塩及び誘導体；レニウム186、ヨード131、イットリウム90等の放射性物質；リシンA、ジフテリアトキシン、TNFなどの生理活性物質及びそれらをコードするDNAなどを用いることができる。もっとも、本発明のリポソームに封入可能な医薬はこれらに限定されることはない。

#### 【0014】

上記医薬の薬学的に許容し得る塩としては、薬学的に許容し得る多価陰イオン性物質との塩、例えば、クエン酸塩、酒石酸塩、グルタミン酸塩、及びそれらの誘導体との塩が好ましい。本発明のリポソームに封入する医薬としては、抗腫瘍剤が好ましい。本発明のリポソームには、治療用の医薬のほか、診断用の医薬を封入することもできる。診断用の医薬としては、放射性元素、例えばインジウム、テクネシウム等のイメージング薬剤；ヨード、ガドリニウム等の造影剤；ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ等の酵素；ユーロピウム誘導体などの蛍光体；N-メチルアクリジウム誘導体等の発光体などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。

#### 【0015】

このらの医薬をリポソームに導入する方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも適用可能である。例えば、リポソーム形成時に水溶液として添加してリポソーム内部に封入してもよい。また、リポソーム形成後、ベジクル内外にpH勾配などの濃度勾配を形成し、このポテンシャルを駆動力としてイオン

化可能な薬剤をリポソーム内部に取り込ませる方法 (Cancer Res., 49, 5922, 1989; BBA, 455, 269, 1976) などを採用することができる。

#### 【0016】

本発明のリポソームは、ポリアルキレングリコール部分を含む化合物で修飾されており、さらに特定量の抗体で修飾されていることを特徴としている。ポリアルキレングリコールとしては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコールなどを用いることができるが、ポリエチレングリコールを用いることが好ましい。ポリエチレングリコールを用いる場合には、分子量が2,000~7,000ダルトン程度のもの、好ましくは約5,000ダルトン程度のものを用いることができる。

#### 【0017】

本発明のリポソームは、上記ポリアルキレングリコール部分を含む化合物がリポソーム表面のマレイミド化脂質にチオエーテル結合を介して結合した形態を有しているが、通常、ポリアルキレングリコールを含む化合物にチオール基を導入した後、この化合物をリポソームのマレイミド基と反応させることにより、ポリアルキレングリコールを結合させたりポソームを製造することができる。ポリアルキレングリコールを含む化合物としては、通常、ポリエチレングリコール基を有し、かつ末端をチオール化可能な化合物又は末端にメルカプト基を有する化合物を挙げることができる。具体的には、例えば、ポリアルキレングリコール基をトリアジンに結合した化合物、さらに該トリアジンがアミノ酸などにより置換された化合物を挙げることができる。この際、ポリアルキレングリコール基を2つ有する化合物 (2本鎖) であってもよい。

#### 【0018】

ポリアルキレングリコールとしてポリエチレングリコールを用いる場合には、例えば、モノメトキシポリオキシエチレンアミンと各種チオールカルボン酸とを脱水縮合する方法；モノメトキシポリオキシエチレンアミンにSPDPでピリジジチオプロピオニル基を導入し、さらに還元する方法；モノメトキシエチレンアミンにイミノチオランによりチオール基を導入する方法；モノメトキシポリオキシエチレンカルボン酸の活性エステルと各種チオールアミンを結合さ

せる方法；ポリエチレングリコールトリアジン誘導体をチオールアミンと縮合する方法などを利用することができる。さらに具体的には、2,4-ビス（ポチエレングリコール）-6-クロロ-s-トリアジン（活性化PEG 2（生化学工業株式会社製））をシスチンと反応させ、さらに還元してシステイン結合活性化PEG 2を得ることができる。

#### 【0019】

本発明のリポソームにおけるポリアルキレングリコール部分を含む化合物の導入量は特に限定されず、残存マレイミド化脂質に対して過剰に反応させてもよいが、ポリアルキレングリコールの好ましい導入量としては、全脂質に対して0.28～0.90モル%程度、より好ましくは0.28～0.56モル%程度、マレイミド化脂質に対しては15～50モル%程度、より好ましくは15～30モル%程度である。

#### 【0020】

本発明のリポソームの修飾に用いる抗体としては、治療対象となる組織、細胞、細菌、ウイルス等と反応性を有する抗体を利用することができ、各種動物のポリクローナル抗体、マウスモノクローナル抗体、ヒトマウスのキメラ抗体、ヒトモノクローナル抗体などを用いることができる。異種動物の蛋白質ではない点から、ヒトモノクローナル抗体がより好ましい。抗体としては、特開平5-304987号公報の実施例1～3に記載されたヒトモノクローナル抗体（GAH抗体）を好適に用いることができ、例えば、上記公報の例7に具体的に示された方法に従って、GAH抗体で修飾したリポソームを製造することができる。抗体の種類と封入すべき医薬との組み合わせを適宜選択することにより、治療効果に優れたリポソームを製造することができる。抗体としては、抗体自体、又は抗体フラグメントのいずれを用いてもよい。本明細書において用いられる「抗体」という用語は、抗体自体及び抗体フラグメントのほか、誘導化又は修飾した抗体などを包含しており、最も広義に解釈しなければならない。

#### 【0021】

抗体にチオール基を付与した後、リポソームのマレイミド基と該チオール化抗体とを反応させることによって、リポソームを抗体で修飾することができる。抗体

へのチオール基の付与は、抗体のアミノ基に対して、蛋白質のチオール化に通常用いるN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピネート (SPDP) (Carlsson, J., et al., Biochem. J., 173, 723, 1978) やイミノチオラン、メルカプトアルキルイミデート (Traut, R.R., et al., Biochemistry, 12, 3266, 1973) 等の化合物を反応させる方法により行なうことができる。また、抗体の内在性ジチオール基を還元してチオール基として反応させることもでき、抗体活性の維持の点から内在性チオール基を用いる方法は好適である。

## 【0022】

例えば、IgGを用いる場合はペプシン等の酵素でF(a b')<sub>2</sub>化し、さらにジチオスレイトール等で還元して得られるF a b' に生じるチオール基をリポソームとの結合反応に利用することができる (Martin, F.J., et al., Biochemistry, 20, 4229, 1981)。IgMの場合には、ミラーらの方法 (J. Biol. Chem., 257, 286, 1965) に準じ、緩和な条件でJ鎖を還元して得られるIgMsのFc部分のチオール基をリポソームとの結合に利用すればよい。特開平5-304987号に記載されたGAH抗体を用いる場合には、F(a b')<sub>2</sub>を用いることが好適である。チオール基が付与された抗体などの蛋白質とマレイミド基を含むリポソームとの結合は、中性の緩衝液 (pH 6.5 ~ 7.5) 中で2 ~ 16時間反応させることにより達成される。

## 【0023】

抗体とポリアルキレングリコール部分を含む化合物とが結合されたりリポソームを製造するためには、まず、マレイミド基を有するリポソームに対して中性の緩衝液中でチオール化抗体を反応させる。例えば、リポソームを構成する全脂質100mgあたり1.2 ~ 2mgの抗体が結合するように、チオール化抗体をマレイミド基1モルに対して、0.1モル%から20モル%程度反応させればよい。ついで、残存しているマレイミド基に対してチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物を反応させ、抗体とポリアルキレングリコール部分を含む化合物とが結合したりリポソームを製造することができる。

## 【0024】

本発明のリポソームの好ましい態様により、医薬、好ましくはドキソルビシンな

どの抗腫瘍剤が封入されており、ポリエチレングリコール部分を含む化合物と抗腫瘍抗体とが結合したリポソームが提供される。上記の医薬含有リポソームは、公知の方法、例えば、脱水法（特表平2-502348号公報）、安定化剤を加え液剤として用いる方法（特開昭64-9331号公報）、凍結乾燥法（特開昭64-9931号公報）等により製剤化することができ、癌などの各種疾患の治療のために、血管内投与、膀胱内投与、腹腔内投与、局所投与などの方法で患者に投与することができる。投与量は有効成分の医薬の種類に応じて適宜選択することができるが、例えばドキソルピシンを封入したリポソームを投与する場合には、有効成分量として50 mg/kg以下、好ましくは10 mg/kg以下、より好ましくは5 mg/kg以下で用いることができる。

【0025】

#### 【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

#### 参考例 1

ジパルミトイルフォスファチジルコリン（DPPC）／コレステロール／ε-マレイミドカプロイルジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン（MC-DPPE）（18／10／0.5モル比）をクロロホルムに溶解し、ロータリーエバポレーターで減圧乾燥した。さらに真空ポンプで減圧して残存溶媒を除去した。得られた脂質フィルム100 mgに対して1 mLの割合で0.3 Mクエン酸緩衝液（pH 4.0）を加え、60℃で加温してボルテックスミキサーで振盪乳化してマルチラメラリポソーム（MLV）を製造した。このMLVをイクストゥルーダー（日油リポソーム社製）を用いて0.2 μmヌクレオポアメンブラン及び0.1 μmのヌクレオポアメンブランを順次通過させて整粒し、ラージユニラメラリポソーム（LUV）を得た。リポソーム外水相を1 Nの水酸化ナトリウム水溶液で中和し、60℃に加温しつつ20 mg/mLのアドリアマイシン（ADM）水溶液を脂質100 mgに対して10 mgの割合で添加した。95%以上のADMがリポソーム内外のpH勾配によりリポソームに装填された。さらに、未封入ADMをゲル濾過で除き、リポソーム外水相を10%シュクロースに調製し

た。

【0026】

## 参考例 2

特開平 5-304987 号公報に記載の GAH 抗体（胃癌反応性モノクローナル抗体）にイミノチオランを反応させて、チオール基を有する抗体を Biochemistry, 12, 3206, 1973 に記載の方法で調製した。また、2,4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジンにシスチンを反応後、還元してチオール基を有するポリエチレングリコール (PEG) を調製した。さらに、参考例 1 と同様にして調製したリポソームに上記のチオール化抗体とチオール化 PEG を順次反応させて、抗体と PEG を結合したリポソームを製造した。

【0027】

## 例 1：本発明のリポソームの製造

### (1) リポソームの調製及び薬物の封入

ジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC) / コレステロール /  $\epsilon$ -マレイミドカプロイルジパルミトイルフォスファチジリエタノールアミン (MCDPPE) (18/10/0.5 モル比) からなる脂質混合物 (1.6 g) に 0.3 M クエン酸緩衝液 (pH 4.0) 16 mL を添加し、水和した後、液体窒素と 60℃ の温浴で凍結融解を 3 回行ないマルチラメラリポソームを作製した。さらに押出し法により 0.1  $\mu$ m に整粒した。このリポソーム溶液に 1 M NaOH を滴下して中和した後、60℃ に加温し、20 mg/mL のドキシソルピシン (DXR) 水溶液を脂質 100 mg あたり 0.5 mL 添加して封入した。

【0028】

### (2) 抗体のチオール化及びリポソームへの結合

1 mM EDTA を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解した GAH 抗体（特開平 4-346918 号公報、特開平 5-304987 号公報に記載のもの、3 mg/mL、14.4 mL）に 3 mg/mL のイミノチオランを 92.4  $\mu$ L 添加し、37℃ で 1 時間反応させてチオール基を導入した。反応液をゲルろ過し、緩衝液を 1 mM EDTA を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に交換した後、ドキシソルピシン 1 mg あたり 0.21 mg のチオール化抗体 (1.7

mg/mL) を加えて 25℃ で 1 時間反応させ、リポソームに抗体を結合させた。

【0029】

(3) ポリエチレングリコールのチオール化及びリポソームへの結合

特開平 4-346918 号公報の方法に従って、シスチンを用いてチオール化 PEG (30 mg/mL、PEG 分子量 5000 の 2 本鎖型 (PEG 5000)) を製造し、上記の反応液 1 mL あたり 0.18 mL 添加して、10℃ で結合反応を行なった。

【0030】

(4) DXR 定量

サンプル 50  $\mu$ L を 50% プロパノール / 0.5 M 塩酸 950  $\mu$ L に添加し、500 nm の吸光度を測定して DXR を測定した。

【0031】

(5) 結合抗体量の定量

PEG 量の定量と同様にして、GPC カラム (東ソー株式会社製、3000 SW XL) を用い、pH 7.0 の緩衝液 (25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、200 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、0.1% SDS) で溶離して抗体を分離し、抗体ピークの 280 nm で検出されるエリア値から定量した。

(6) 脂質量

脂質 (DP PC 及びコレステロールの総量) は HPLC 法により定量した。ローカラム ODS (化学品検査協会) 4.6 mm  $\times$  250 mm に負荷し、テトラヒドロフラン (THF) / アセトニトリル / 水 (2:1:1、V/V) で溶離した。215 nm で検出を行ない、DP PC に由来するピーク及びコレステロールに由来するピークのエリア値から定量した。脂質定量用サンプルはリポソームサンプル 1 容に対して上記溶離液 9 容を加えて調製した。

【0032】

例 2: 本発明のリポソームによる治療効果

例 1 の方法に従って、リポソーム全脂質 100 mg に対して抗体を 0.5、1.2、2.0、4.5、5.3、及び 11.4 mg 結合させた下記のリポソーム 2

～7 (DXR封入、PEG5000結合) を調製した。同様にして、抗体を結合していないリポソーム1を製造した。なお、PEG結合リポソームでは、下記に示したPEG結合量範囲内において各リポソームの血中滞留性は同等であるため、以下に示す実験結果は抗体結合量に依存する。

## 【0033】

【表1】

リポソーム	抗体結合量 mg/100mg 脂質	DXR封入量 mg/100mg 脂質	PEG結合量 mg/100mg 脂質
1	0	9.5	8.2
2	0.5	9.1	8.2
3	1.2	9.5	8.1
4	2.0	8.9	5.3
5	4.5	9.6	6.2
6	5.3	9.7	6.4
7	11.4	10.0	3.2

## 【0034】

胃癌細胞株MKN45をヌードマウスの背側2ヶ所 ( $1 \times 10^6$ 細胞/1ヶ所) に皮下移植した。薬効試験においては、腫瘍の長径、短径の測定が可能な十分な大きさに達した時点で、抗体結合量の異なるリポソームの投与を開始した。リポソームの投与量は、1回あたり5.0mg/kg (DXR量換算) とし、陽性対照としてDXR投与群 (5.0mg/kg) を設け、コントロール群には生理食塩水を投与した。全群につき、投与開始日 (0日)、3日目、及び6日目に静脈内投与を行なった。

## 【0035】

経時的に腫瘍径 (長径、短径) を測定し、推定腫瘍重量 (短径<sup>2</sup>×長径/2) を算定した。3回の投与終了後、19日目まで測定を継続した。各腫瘍の投与開始日の推定腫瘍重量を1.0として腫瘍増殖度を算出し、コントロール群、DXR投与群に対する各処置群の腫瘍増殖抑制効果を評価した。最終測定日 (19日目) の各処置群について%T/C値 (処置群の腫瘍増殖度/コントロール群の腫瘍増殖度×100) を算定し、各サンプルの抗体結合量との関係から、腫瘍増殖抑制効果が最大となる抗体結合量 (最適値) を求めた。



## 【0036】

その結果、コントロール群に対しては全ての処置群に有意な腫瘍増殖抑制効果が確認され、DXR投与群に対しては、図1に示すように、結合抗体量が0.5～2.0mg/100mg全脂質の範囲のサンプルに有意な腫瘍増殖抑制性効果が認められ、抗体結合量として2mg/100mg全脂質付近をピークとした腫瘍増殖抑制活性が認められた。

## 【0037】

動態試験においては、マウスに抗体結合量の異なる上記リポソーム4～7（2.0、4.5、5.3、及び11.4mg/100mg全脂質）を静脈内投与し（一群2～3匹、1.0mg/kg、DXR量換算）、投与4時間後に各個体から血漿を採取した。蛍光測定法により血漿中のDXR量を測定した。各サンプル投与後の血漿中のDXR量を比較し、抗体結合量とDXR封入抗体結合リポソームの血中滞留性との関係を求めた。動態試験において抗体結合量2mg/100mg脂質以上の各サンプルについて、各サンプル投与後の血漿中DXR量と各サンプルの抗体結合量との関係を求めた（図2）。その結果、抗体結合量が2mg/100mg脂質を上回ると、抗体結合量に依存して血中滞留性が低下することが認められた。

## 【0038】

血漿中のDXRは以下に示す蛍光測定法により測定した。血漿100μLに0.3M塩酸-50%エタノール（塩酸エタノール）1mLを加え、60℃で10分間加熱してDXRを抽出し、4℃に冷却して15000rpmで10分間遠心して上清を採取した。この試料を塩酸エタノールで4倍に希釈し、励起波長490nm、蛍光波長590nmの蛍光を測定した。塩酸エタノールで希釈した既知濃度のDXRを用いて検量線を作製し、血漿中のDXRを定量した。なお、マウス血漿からのDXR回収率は、DXR換算3.75μg/mL～30μg/mL範囲において95～98%であった（参考文献；Cancer Res., 47, 4471, 1989）。

## 【0039】

## 【発明の効果】

本発明のリポソームは、従来の抗体結合リポソームに比べて、優れた治療効果を達成できるという特徴がある。

【図面の簡単な説明】

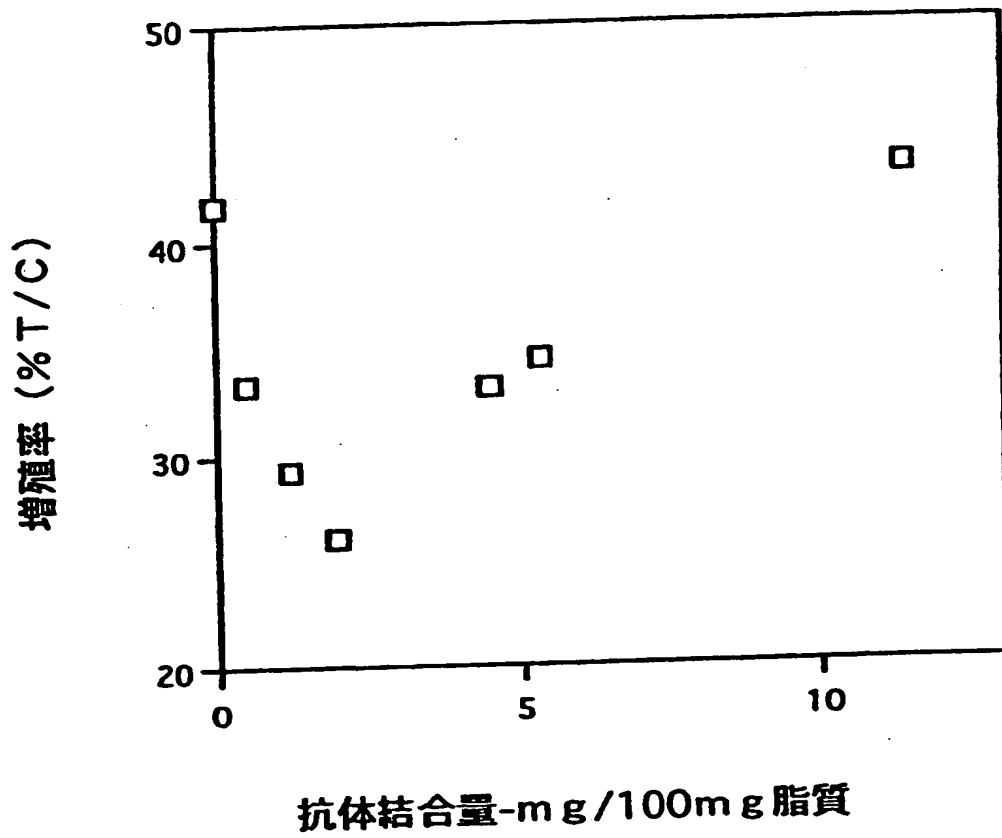
【図 1】 リポソーム（DXR封入）に結合した抗体量と腫瘍抑制効果（%T/C）との関係を示した図である。

【図 2】 抗体結合量を 2mg/100mg 脂質以上とした各サンプルについて血漿中DXR量（血中滞留性）と抗体結合量との関係を示した図である。

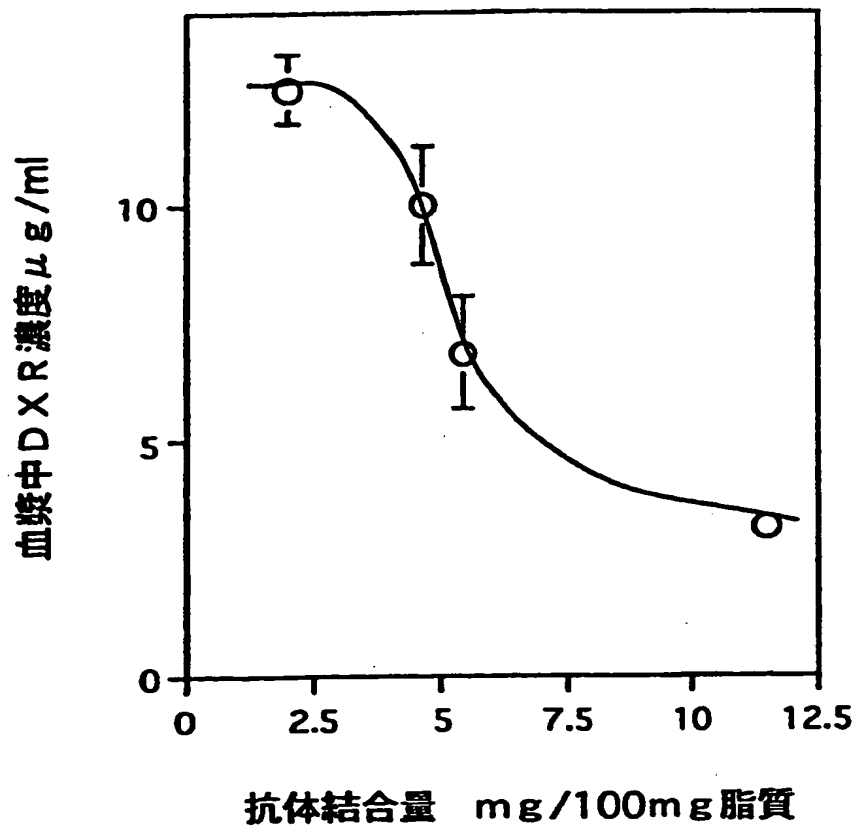
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗体及びポリアルキレングリコールが結合されており、優れた治療効果を達成できるリボソームを提供する。

【解決手段】 脂質末端の一部がマレイミド化されたりボソームにポリアルキレングリコール部分を含む化合物及び抗体がそれぞれチオエーテル基を介して結合したリボソームであって、該抗体の結合量がリボソームを構成する全脂質 1 0 0 m g に対して 1 . 2 ~ 2 m g であるリボソーム。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000005968]

1. 変更年月日	1994年10月20日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
氏 名	三菱化学株式会社